



## بررسی مقایسه‌ای بین روش‌های غرقابی، مایکروویو و فراصوت جهت استخراج عصاره پوست لیموترش و بررسی خصوصیات ضد اکسیدانی آن

زهرا لطیفی<sup>۱\*</sup>، مریم درویش حسینی<sup>۲</sup>، آمنه صدیقی پاشاکی<sup>۳</sup>، زهرا غفوری<sup>۴</sup>، لیلا نجفی<sup>۵</sup>، عاطفه ارجمندیان<sup>۶</sup>

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، مازندران، ایران.

۲- دانش آموخته کارشناسی مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه پیام نور مرکز قزوین، ایران.

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴- دانشجوی دکتری، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد اهواز، دانشگاه دولتی شهید چمران، خوزستان، ایران.

۵- دانش آموخته کارشناسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، گیلان، ایران.

۶- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، مازندران، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۶

کلمات کلیدی:

فعالیت ضد اکسیدانی، عصاره پوست لیموترش، روش غرقابی، فراصوت، مایکروویو.

لیمو با نام علمی **CitrusLemon** یکی از گیاهان دارویی می‌باشد که عمدتاً بخاطر ترکیبات آکالوئیدی، خواص مغذی و آنتی‌اکسیدانی موجود در آن پرورش داده می‌شود. عصاره پوست لیموترش سرشار از ترکیبات توکوفرولی، فنلی، فلاونوئیدی و ویتامین ث می‌باشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی را از خود نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی مقایسه‌ای بین روش‌های استخراج با حلال، مایکروویو و فراصوت بر خصوصیات ضد اکسیدانی عصاره پوست لیمو ترش است. تأثیر روش‌های مختلف استخراج غرقابی، مایکروویو و فراصوت با استفاده از حلال اتانول:آب (۷۰:۳۰) بر میزان استخراج ترکیبات فنلی، توکوفرولی و فعالیت ضد اکسیدانی و بررسی بی‌رنگ شدن بتاکاروتن- لینولئیک و میزان ویتامین ث عصاره پوست لیموترش برای به دست آوردن بهترین بازده استخراج جهت استفاده مناسب از عصاره انجام شد و فعالیت ضد اکسیدانی و درصد مهار اکسیداسیون لینولئیک اسید عصاره با آنتی‌اکسیدان سنتزی **BHT** مقایسه شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان ترکیبات یاد شده تحت تأثیر روش‌های مختلف استخراج بوده بطوری که میزان ترکیبات فنلی (۴۸۰ میلی گرم گالیک اسید بر گرم)، توکوفرول (۱۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و آسکوربیک اسید (۸۵ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) در روش استخراج با فراصوت بالاترین میزان را به خود اختصاص دادند. همچنین درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد **DPPH** (۹۱ درصد) و درصد بی‌رنگ شدن بتاکاروتن (۵۸ درصد) در عصاره استخراج شده به روش فراصوت بالاترین درصد بازدارندگی را نشان دادند با اینحال در مقایسه با **BHT** دارای درصد بازدارندگی کمتری بودند. با توجه به نتایج این تحقیق با استفاده از روش فراصوت می‌توان به عصاره‌هایی دست یافت که از نظر فعالیت ضد اکسیدانی تفاوت چشمگیری با آنتی‌اکسیدانی **BHT** ندارد.

DOI: 10.52547/fsct.18.09.27

\* مسئول مکاتبات:

yasamin.latifi131@yahoo.com

## ۱- مقدمه

ترکیبات فنولی به فنول‌های ساده، اسیدهای فنولی، مشتقات هیدروکسی سینامیک و فلاونوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند. عملکرد بسیاری از ترکیبات فنولی به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی توسط محققین گزارش شده است [۱]. آنتی‌اکسیدان مولکولی است که قادر به کاهش یا جلوگیری از اکسیداسیون مولکول‌های دیگر می‌شود. واکنش‌های اکسیداسیونی می‌تواند رادیکال‌های آزاد تولید کند که شروع کننده واکنش‌های زنجیره‌ای است و می‌تواند به سلول‌ها صدمه بزند [۲]. ویژگی‌های سلامت‌بخش آنتی‌اکسیدان‌ها و نقش آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها، دلایل عمده استفاده زیاد از آنها می‌باشد. در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها از فرآیند اکسیداسیون که از عوامل بروز بیماری‌هایی همچون سرطان است پیشگیری کرده و از این جهت اثرات خود را بر سلامت انسان می‌گذارند. علاوه بر این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی معمولاً به منظور جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، در برخی محصولات به عنوان افزودنی اضافه شده که باعث افزایش زمان ماندگاری نیز خواهد شد [۳]. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی ممکن است به منظور کنترل اکسیداسیون چربی و روغن‌ها و همینطور جلوگیری از فساد مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه از نظر جنبه‌های سلامتی و همچنین عدم پذیرش آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی توسط مصرف‌کنندگان، کاربرد آنها در فرآورده‌های غذایی محدود شده است. بنابراین تلاش جهت یافتن جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، منجر به بررسی آنتی‌اکسیدان‌هایی از منابع گیاهی شده است [۴].

لیمو از خانواده Rutaceae و با نام علمی Citrus lemon L. یکی از گیاهان دارویی می‌باشد که عمدتاً بخاطر ترکیبات آلکالوئیدی موجود در آن پرورش داده می‌شوند. فلاونوئیدهای موجود در جنس Citrus دارای اثرات زیستی متعددی مانند: ضد دیابت، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی و ضد ویروسی می‌باشند [۵]. پوست میوه لیمو منبع غنی از فلاونوئیدهای گلیکوزیدی، کومارین، گلیکوزیدها، بتا و گاما سیستوسترول و روغن‌های فرار می‌باشد [۶]. نحوه عصاره‌گیری از این مرکبات، به عنوان اولین مرحله کلیدی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، بسیار مهم است. اندام‌های گیاهی و سیستم‌های حلالی انتخاب شده می‌تواند روی کمیت و نوع ترکیبات جدا شده تأثیر بگذارد. از این جهت؛ تجربیات

متعددی به منظور بهینه‌سازی روش‌های استخراج و مقایسه آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های یک گیاه آزمون شده است. همچنین انتخاب روش استخراج به نوع بافت گیاهی نیز بستگی دارد [۷].

استخراج با دستگاه سوکسله و خیساندن روش‌های رایجی هستند که به کمک حلال‌هایی با قطبیت‌های مختلف انجام می‌گیرد. این امر نیاز به صرف زمانی طولانی دارد و باعث استخراج طیف وسیعی از مواد شیمیایی می‌شود [۸]. استخراج با کمک مایکروویو و سیال فوق بحرانی و امواج فراصوت (اولتراسوند) روش‌های جدیدی هستند که از نظر کوتاه شدن زمان استخراج، کاهش مقدار حلال مصرف شده و حفظ خاصیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نسبت به روش‌های سنتی مزیت‌های زیادی دارند [۹]. امروزه استفاده از امواج فراصوت با توجه به اثرات مؤثر آن در نگهداری و فرآیند مواد غذایی رو به گسترش می‌باشد. اثرات مکانیکی امواج فراصوت و پدیده کاویتاسیون ایجاد شده در اثر این امواج، سبب افزایش نفوذپذیری حلال به داخل سلول‌های گیاهی، افزایش انتقال جرم و به دنبال آن افزایش بازدهی استخراج در دماهای پایین‌تر می‌شود [۱۰].

در پژوهشی که رودریگیز — روجو و همکاران (۲۰۱۲) برای مقایسه سه روش استخراج سنتی، مایکروویو و فراصوت انجام دادند، استخراج با امواج فراصوت به عنوان بهترین روش استخراج ترکیبات فنلی از برگ رزماری انتخاب شد و پس از آن روش مایکروویو و سنتی قرار گرفت [۱۱]. در مطالعه‌ای که سندگل و همکاران (۲۰۱۷) به منظور تأثیر روش‌های استخراج فراصوت، مایکروویو و غرقابی روی برگ گردو انجام دادند، بالاترین میزان ترکیبات فنلی را مربوط به برگ گردو با روش استخراج فراصوت (mg GA/g of extract)  $245/08 \pm 0/46$  و کمترین مقدار آن به عصاره استخراج شده با روش غرقابی (mg GA/g of extract)  $170/49 \pm 7/4$  بوده است [۱۲].

پوست مرکبات به عنوان ضایعات (محصول جانبی) آبیگری از مرکبات مطرح است، لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمارهای استخراج با حلال، مایکروویو و فراصوت بر خصوصیات ضد اکسیدانی عصاره ی پوست لیمو ترش است.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- تهیه مواد اولیه

میوه لیمو ترش در نیمه دوم خرداد بصورت تصادفی و از نظر اندازه یکسان و بدون هرگونه لک و آسیبی بر روی پوست انتخاب شده از بازار محلی در شهرستان رشت تهیه شد. پس از انجام مراحل پاکسازی و حذف هرگونه آلودگی از لیموهای تهیه شده، با رعایت مقررات و ضوابط بهداشتی قسمت خارجی پوست لیمو به وسیله چاقو تیز جدا گردیده و به مدت یک روز (۲۴ ساعت) در آون (شرکت بهداد، مدل ۳۴۹۴، ساخت کشور ایران) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پوست لیموهای خشک شده توسط آسیاب برقی به پودری با ذرات کاملاً ریز تبدیل شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

## ۲-۲- استخراج با حلال(عصاره هیدروالکلی و آبی)(روش غرقابی)

پودر پوست لیموترش به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با آب:اتانول (۳۰:۷۰) مخلوط و دور از نور به مدت ۲۴ ساعت در شیکر (LABTRON Ls-100) با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در سه مرحله عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور بر دقیقه هر بار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (HERMIE z200A, Germany) و قسمت شفاف بالای مخلوط جدا گردید تا دیگر رسوبی در ته لوله دیده نشود. سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره سه صاف شدند. جداسازی حلال و تغلیظ شدن عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلأ (TAM 2times, Iran) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (با هدف جلوگیری از آسیب ترکیبات فنولی) و ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت پخش گردید و در داخل آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که عصاره بطور کامل خشک گردید. سپس درب پلیت را گذاشته، دور آن را با پارافیلیم بسته و برای جلوگیری از نفوذ نور بطور کامل با فویل آلومینیومی پوشانده شد و تا زمان انجام آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۳].

## ۲-۳- استخراج به کمک حمام فراصوت

پودر پوست لیموترش به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با آب:اتانول (۳۰:۷۰) مخلوط شدند و سپس مخلوط‌های بدست آمده در حمام اولتراسوند (Tecno-Gas.S.P.A, ایتالیا) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز و با توان خروجی ۲۰۰ وات قرار گرفت. سپس عصاره‌های استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره سه صاف شدند [۱۷]. دما در طی فرآیند عصاره‌گیری با استفاده از حمام آب (memmert WNB, Germany, 14) ثابت نگه داشته شد و به منظور کنترل دما از دماسنج استفاده گردید. عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (HERMIE z200A, Germany) و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط جدا گردید. جداسازی حلال و تغلیظ شدن عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلأ (TAM 2times, Iran) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (با هدف جلوگیری از آسیب ترکیبات فنولی) و ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت پخش گردید و در داخل آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که عصاره بطور کامل خشک گردید. سپس درب پلیت را گذاشته، دور آن را با پارافیلیم بسته و برای جلوگیری از نفوذ نور بطور کامل با فویل آلومینیومی پوشانده شد و تا زمان انجام آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۴].

## ۲-۴- استخراج با مایکروویو

پودر پوست لیموترش به نسبت ۱ به ۵ (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) با آب:اتانول (۳۰:۷۰) مخلوط شدند و سپس مخلوط‌های بدست آمده درون محفظه دستگاه مایکروویو (LG 3853, Korea) به مدت ۶ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و با توان ۸۵۰ وات قرار گرفت و عصاره‌گیری انجام گردید. در طول فرآیند، زمان، دما، فشار و قدرت، تحت کنترل بود. پس از اتمام زمان عصاره‌گیری، محلول از مایکروویو خارج شد و اجازه داده شد به دمای اتاق برسد. سپس عصاره استخراج شده با ۷۸۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (HERMIE z200A, Germany) و سپس قسمت شفاف بالای مخلوط جدا گردید.



گردید. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از مقایسه جذب نوری نمونه‌ها با زمان صفر و از روی میزان پایداری رنگ زرد بتاکاروتن به درصد مورد سنجش قرار گرفت [۱۹].

## ۲-۹- اندازه‌گیری ویتامین ث

اندازه‌گیری ویتامین ث به وسیله دستگاه (KNAUER HPLC ساخت آلمان) و جداسازی با ستون یوروسفر (Eurospher، C18، ۲۵۰\*۴،۶\*۵) انجام گرفت. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و دمای ستون در ۲۵ درجه سانتیگراد ثابت بود. از بافر فسفات ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Monopotassium phosphate) با  $\text{pH} = 2.8$  به عنوان حلال استفاده شده و جذب نمونه در طول موج‌های ۲۰۰، ۲۱۰، ۲۱۴، ۲۳۰ نانومتر بررسی و کروماتوگرام‌ها به وسیله نرم‌افزار (Ezchromelite) ثبت شد. به وسیله مقایسه سطح زیر پیک‌ها و زمان بازداری (Retention times) با معادلات از نمودار استاندارد اسید آسکوربیک که با رقت‌های ۵-۴۰۰ پی.پی.ام تهیه شده بود مقدار ویتامین ث تعیین گردید [۲۰].

## ۲-۱۰- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور آنالیز آماری و مقایسه نتایج آزمون‌های صورت گرفته از طرح کاملاً تصادفی از جدول واریانس یک‌طرفه ANOVA استفاده گردید. برای اختلاف میانگین‌ها از آزمون دانکن ( $p > 0.05$ ) و از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ استفاده گردید.

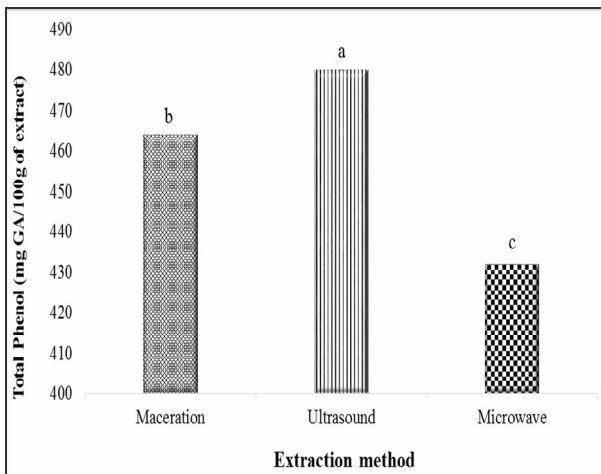
## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- بررسی مقادیر ترکیبات فنولی عصاره

نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی (میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره) عصاره پوست لیموترش با روش‌های مختلف استخراجی در شکل (۱) نشان داده شده است. با اینکه در هر سه روش عصاره‌گیری غرقابی، فراصوت و مایکروویو، نسبت نمونه به حلال، مشابه هم انتخاب شده بود (۲۰ گرم نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال اتانولی ۷۰٪) ولی تیمار فراصوت، منجر به استخراج مقدار بیشتری از ترکیبات فنولی عصاره نسبت به دو روش دیگر گردید. پس روش استخراج، تأثیر معنی‌داری

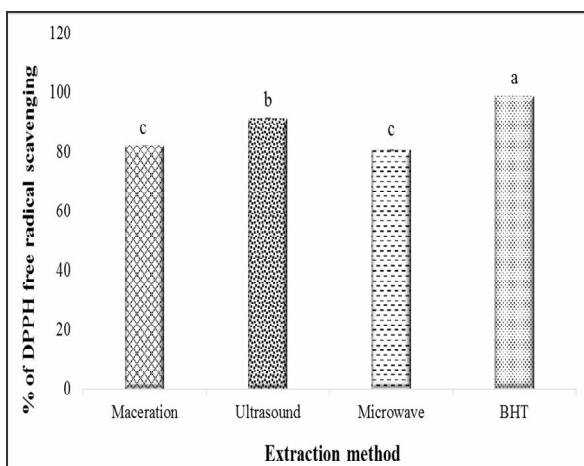
بر میزان استخراج ترکیبات فنولی عصاره پوست لیمو ترش داشته است. بیشترین میزان ترکیبات فنولی (۴۸۰ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره) و کمترین (۴۳۲ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره) میزان ترکیبات فنولی به ترتیب در عصاره استخراج شده با روش فراصوت و مایکروویو مشاهده شد. در روش غرقابی نیز عصاره استخراج شده به میزان ۴۶۴ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره بود.

ترکیبات فنولی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌باشند که بطور گسترده در سراسر گیاه پخش شده‌اند. ترکیبات فنولی خواص آنتی‌اکسیدانی خوبی دارند. مهم‌ترین عملکرد این ترکیبات در ارتباط با اکسیداسیون، غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی می‌باشد [۲۱]. روش فراصوت باعث تخریب دیواره‌های سلول‌های زیستی شده و سبب خروج بیشتر ترکیبات فنولی و زیست‌فعال نسبت به سایر روش‌ها می‌شود. در این روش امواج فراصوت با فرکانس بالاتر از ۲۱ کیلوهرتز، به داخل ماده نفوذ کرده، موجب کشیدگی و جمع شدن‌های پی در پی شده که در نتیجه آن حفراتی در دیواره‌ی سلولی ایجاد می‌شود. این حفرات بطور نامتقارن به هم پیوسته و موجب خروج ماده از داخل سلول به خارج از آن می‌شود [۲۲].



**Fig 1** Average total amount of phenolic compounds of extract based on extraction method

حسن‌نیا و همکاران (۱۳۹۵) در مورد استخراج ترکیبات فنولی از عصاره شوید به نتایج مشابهی دست یافتند [۲۳]. اسماعیل‌زاده کناری و همکاران (۲۰۱۴) نیز اذعان کردند که روش فراصوت تأثیر مثبتی روی استخراج میزان فنول عصاره کنگد دارد [۲۲]. علت پایین‌تر بودن قابل توجه میزان ترکیبات فنولی در روش استخراج با مایکروویو نسبت به سایر روش‌ها



**Fig 2** Comparison of Free Radical DPPH Extract of Lemon peel

### ۳-۳- بررسی میزان ترکیبات توکوفرولی

شکل (۳)، میانگین میزان کل ترکیبات توکوفرولی عصاره پوست لیموترش را بر اساس روش استخراج نشان می‌دهد. میزان توکوفرول استخراجی با تیمار فراصوت ۱۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که بطور معنی‌داری از سایر روش‌ها بالاتر بود ( $p < 0/05$ ). اما مقادیر استخراجی توکوفرول در روش غرقابی (۱۱۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با روش مایکروویو (۱۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری نشان نداد. ترکیبات توکوفرولی قطبیت پایین دارند پس استفاده از ترکیبات قطبی باعث می‌شود ترکیبات توکوفرولی با درجه‌ی قطبیت پایین به میزان کمتری استخراج شوند. اما با توجه به مناسب بودن روش استخراج فراصوت برای ترکیبات با قطبیت پایین را می‌توان دلیل بالا بودن ترکیبات توکوفرولی در این روش دانست [۲۷].

توکوفرول‌ها ترکیباتی محلول در چربی می‌باشند که دارای خاصیت ویتامینی و آنتی‌اکسیدانی هستند و بطور مؤثر و به شکل یک فرآورده نسبتاً پایدار به تخریب رادیکال‌های پروکسی و قطع مرحله انتشار در واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو می‌پردازند. توکوفرول‌ها شامل: چهار ایزومر آلفا، بتا، گاما و سیگما هستند که نوع آلفا توکوفرول بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارد [۲۹ و ۳۰]. لذا در این مقاله ترکیبات توکوفرولی بر اساس آلفا توکوفرول تعیین و گزارش شد. قاسمی و همکاران (۹۶) در بررسی تیمارهای مختلف استخراج بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست به و صداقت و نجفیان (۹۷) در بررسی عصاره‌ی برگ توت، بالاترین میزان ترکیبات توکوفرولی را در عصاره‌ی استخراج شده به روش فراصوت گزارش کردند [۲۸ و ۳۱]. حسن‌نیا و همکاران (۱۳۹۵) در نتایج

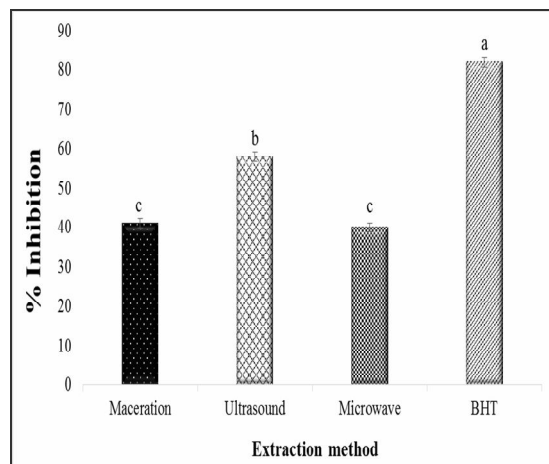
را می‌توان به دمای بالای محفظه دستگاه مایکروویو ( $100^{\circ}\text{C}$ ) مربوط دانست؛ دماهای بالاتر منجر به تخریب این ترکیبات زیست فعال می‌شود [۲۴].

### ۳-۲- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون

#### DPPH

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش‌های مختلف استخراج و آنتی‌اکسیدان سنتزی تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال آزاد DPPH دارد. بر اساس نتایج بدست آمده (شکل ۲)، بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد و قدرت احیا کنندگی DPPH در تیمار BHT به میزان ۹۸ درصد مشاهده شد که بطور معنی‌داری از سایر روش‌های استخراج، بالاتر بود. میزان بازدارندگی در استخراج با روش فراصوت (۹۱ درصد)، روش غرقابی (۸۲ درصد) و روش مایکروویو (۸۰ درصد) بود؛ مقایسه دو تیمار غرقابی و مایکروویو نشان داد که اختلاف معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) از نظر بازدارندگی اکسیداسیون بین این دو تیمار وجود ندارد، اما میزان مهار رادیکال آزاد DPPH تیمار فراصوت بطور معنی‌داری از آنها بالاتر است. عصاره‌های گیاهی به علت دارا بودن ترکیبات فنولی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت بالایی برای اهدای اتم هیدروژن یا الکترون و الکترون آزاد می‌باشند [۲۵]. استفاده از رادیکال پایدار DPPH یکی از روش‌های معتبر، دقیق، آسان و مقرون به صرفه با تکرارپذیری بالا می‌باشد که جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۶]. از این رو در این آزمون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر حسب درصد کاهش در میزان جذب محلول‌های DPPH در حضور عصاره‌های فنولی نسبت به محلول فاقد عصاره بیان گردید. بالاتر بودن میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در روش فراصوت را می‌توان به بالاتر بودن میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ی استخراج شده با این تیمار دانست. عیسی‌پور و همکاران (۱۳۹۶) و صداقت و نجفیان (۱۳۹۷) به ترتیب در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست لیموترش و عصاره برگ توت سفید به این نتیجه رسیدند که هرچقدر مقدار ترکیبات فنولی در عصاره بالاتر باشد، خاصیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH نیز بیشتر می‌شود [۲۷ و ۲۸].

اسید لینولئیک استفاده می‌شود [۲۲]. با آزمون بی‌رنگ شدن بتاکاروتن می‌توان به قدرت خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها پی برد. به این صورت که مواد ناشی از اکسیداسیون اسید لینولئیک با بتاکاروتن برهمکنش داده، سبب تجزیه هیدروپراکسیدهای تولیدی و کاهش رنگ شده و در نتیجه میزان جذب کاهش می‌یابد [۳۴]. نمونه‌های استخراج شده با روش‌های غرق‌سابی و مایکروویو از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. تحقیقاتی که در زمینه بررسی میزان مهار اسید لینولئیک عصاره‌ی پوست لیموترش صورت گرفت، عصاره‌های استخراج شده با تیمارهای مختلف حلال، فراصوت و مایکروویو، پتانسیل بالایی در مهار اکسیداسیون اسید لینولئیک داشتند و میزان بازدارندگی اکثر عصاره‌ها تفاوت معنی‌داری با آنتی‌اکسیدان سنتزی نشان نداد [۲۷]. در تحقیق دیگری که روی عصاره برگ توت سفید انجام شد، محققان گزارش کردند که در تمام غلظت‌های مورد بررسی، نمونه‌های فراصوت بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر روش‌ها نشان دادند [۲۸].

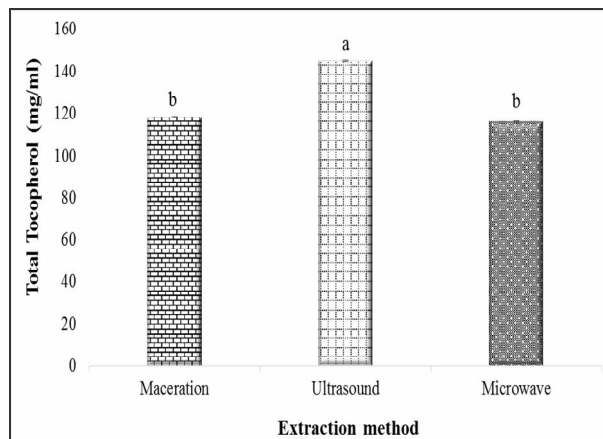


**Fig 4** Percent inhibition of linoleic oxidation of lemon peel extract in extraction methods and comparison with BHT

### ۳-۵- بررسی میزان ویتامین ث

شکل (۵) مقادیر ویتامین ث بدست آمده از عصاره پوست لیمو ترش در روش‌های استخراج مورد استفاده در این تحقیق را نشان می‌دهد. مقدار ویتامین ث بدست آمده از تیمار فراصوت (۸۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم نمونه) بطور معنی‌داری از سایر روش‌های استخراج بالاتر بود. مقادیر بدست آمده ویتامین ث در روش غرق‌سابی و مایکروویو اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. ویتامین ث یا اسید آسکوربیک یک آنتی‌اکسیدان بسیار

بدست آمده از تحقیقات خود در بررسی میزان توکوفرول‌های عصاره شوید گزارش کردند که روش استخراج فراصوت برای ترکیباتی مانند توکوفرول‌ها که قطبیت پایینی دارند روش مناسبی می‌باشد [۲۳].



**Fig 3** The average total amount of lemon peel extracts of tocopherol compounds based on extraction method

### ۳-۴- بررسی بی‌رنگ شدن بتاکاروتن -

#### لینولئیک

شکل (۴) مقادیر درصد بازدارندگی از اکسایش لینولئیک اسید را در روش‌های مختلف استخراج عصاره پوست لیمو ترش نشان می‌دهد. همان طور که از شکل مشخص است بیشترین میزان بازدارندگی از اکسایش (۸۲ درصد) با اختلاف معنی‌داری مربوط به آنتی‌اکسیدان سنتز BHT است. در مطالعه حاضر، در بین روش‌های مختلف استخراج، روش فراصوت با بازدارندگی ۵۸ درصد بیشترین میزان بازدارندگی از اکسایش را دارد که با نتایج حاصل از تحقیق عصاره‌گیری از برگ شاه توت با استفاده از ۳ حلال: اتانول ۷۰ درصد و اتانول ۵۰ درصد و آب بصورت مجزا و به کمک فراصوت و مایکروویو توسط هدایت‌زاده ابهری و اسماعیل زاده کناری (۲۰۱۴) انجام شد، مطابقت داشته است. این پژوهشگران بیشترین مقدار توکوفرول در عصاره‌ی استخراج شده به روش فراصوت و به کمک حلال هیدرواتانولی را گزارش کردند [۱۵ و ۳۲].

رادیکال‌های سنتزی DPPH از روش‌های مهم برای نشان دادن قدرت و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند؛ اما نمی‌توانند با سویسترای اکسیژن بیولوژیکی ترکیب شوند. بنابراین، اطلاعات دقیق و مشخصی از فعالیت مهار رادیکال‌ها در عصاره نمی‌دهند [۳۳]. به این علت است که برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره از روش بتاکاروتن / امولسیون



## ۵- منابع

- [1] Serrano, J., Goñi, I. and Saura-Calixto, F. 2006. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research International*, 40: 15-21.
- [2] Karmali M.A. 1989. *Microbiol. Rev.*, 2: 15.
- [3] Shi, J, Nawaz, H, Pohorly, J, Mittal, G. 2005. Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods-Engineering and Technology. *Food Reviews International*, 21: 1-12.
- [4] Park, T.D, Adams, D.A, Zhou, K, Harris, M, Yu, L. 2000. Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of Food Science*. 68: 41240-1243.
- [5] Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *Int. Food Microbiol*; 94 (3): 223- 253.
- [6] Arkadiusz, S, Roszko, M, Sosin'ska, E, Derewiaka, D, Lewicki, P, 2010, Chemical Composition and Oxidative Stability of Selected Plant Oils, *J Am Oil Chem Soc*, 87:637-645.
- [7] Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J, 2003, Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83, 255 - 262.
- [8] Ben-Ali, M, Dhouib, K, Damak, M, Allouche, N, 2014, Stabilization of Sunflower Oil During Accelerated Storage: Use of Basil Extract as a Potential Alternative to Synthetic Antioxidants, *International Journal of Food Properties*, accepted article.
- [9] Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. and Mason, T.J., 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics sonochemistry*, 11(3-4), pp.261-265.
- [10] Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.
- [11] Rodriguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.*, 109, 98-103.

قوی است و بطور گسترده‌ای در طبیعت وجود دارد به خصوص در برگ سبزیجات و میوه جات تازه یافت می‌شود [۳۵]. در مطالعه‌ای بین مقایسه دو روش استخراج سوکسله و فراصوت در عصاره پوست لیمو، بالاترین میزان آسکوربیک اسید در روش فراصوت تحت شرایط دمائی ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد گزارش گردید؛ آنها در ادامه بیان کردند فراصوت پدیده انتقال جرم را افزایش می‌دهد و اجازه دسترسی بیشتر حلال به مواد سلولی و ماتریس را می‌دهد تورم سلول‌های گیاهی و تجزیه دیواره سلول‌های گیاه به دلیل روند کاویتاسیون مشاهده می‌شود از جمله عواملی که بر عملکرد فراصوت حاکم هستند شامل دما، فشار، فرکانس و زمان فراصوت هستند که از عوامل بسیار مهم می‌باشند و نیاز به مطالعه دقیق دارند [۳۶]. برخی از مزایای استخراج با فراصوت مانند کاهش زمان استخراج، انرژی و مصرف کمتر حلال است [۳۷].

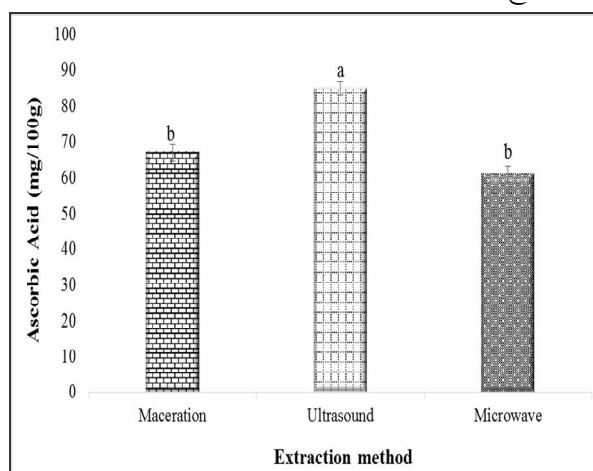


Fig 5 The effect of extraction method on the amount of vitamin C extract of sour lemon peel

## ۴- نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان می‌دهد که پوست لیموترش حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولی و توکوفرولی با خواص آنتی‌اکسیدانی بالاست و روش فراصوت یک روش بهینه جهت استخراج این ترکیبات نسبت به دو روش غرقابی و مایکروویو می‌باشد. با افزایش میزان ترکیبات فنولی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از روش فراصوت مشابه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود که این امر نشان می‌دهد که این عصاره می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنایع بهداشتی، دارویی و غذایی شود.



- juices determined by HPLC: influence of the wavelength of detection. *Italian Journal of Food Science*, 16: 79-85.
- [21] Prakash V. 1990. Leafy spices. CRC Press, Boca Raton, pp 1-2.
- [22] Esmailzadeh kenari R., Mohsenzadeh, F., and Amiri, Z., 2014. Antioxidant activity and total phenolic compound of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound assisted extraction methods. *Food Science and Nutrition*, doi:10.1002/fsn3.118.
- [23] Hasannia, M., Ariaii, P., Fattahi, E. 2016. The effect of extraction methods on phenolic and tocopherol content and antioxidant properties of dill extracts (*Anethum graveolens*). *Quarterly Journal of Food Science and Technology University of Tarbiat Modarres University JFST No. 57, Vol. 13.* [In Persian.]
- [24] Chirinos. R, Rogez. H, Campos. D, Pedreschi. R, Larondelle. Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon). *Separation and Purification Technology*, 55:217-225.
- [25] Demirci. B, Kosar. M, Demirci. F. 2007. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. *J Agric Food Chem*. 105:1512-1517.
- [26] Zou. T, Wang. D, Guo. H, Zhu. Y, Luo. X, Liu. F. 2012. Optimization of microwave assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *J Food Sci*. 77(1):C46-50.
- [27] Hossein Pour. F., Alaadini. B., Roozbeh Nasirayi. L. 2017. The effect of modern extraction methods on antioxidant properties of sour lemon peel extract. *First National Conference on New Technologies in Iranian Food Science and Technology. Babolsar-Mazandaran.* [In Persian.]
- [28] Sedaghat. B., Najafian. L., 2017. Effect of different extraction methods on phenolic compounds and antioxidant properties of white mulberry (*Morus alba* L.) leaf extract. *Food Processing and Maintenance Journal* Volume tenth, first issue, 9. *EJFPP*, Vol. 10 (1): 85-98. [In Persian.]
- [29] Farahmandfar, R. 2012. *Comprehensive chemistry and technology of edible oil*. Sahra press, 248p. [In Persian.]
- [12] Sandgol, I., Amiri Raftani, Z., Mohammadzadeh Milani, j., (2017). The Effect of Different Extraction Methods on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Walnut Leaves in Shahrood, Damavand, and Thousands. *Quarterly Journal of Modern Food Technology*. Volume 5, Issue 2, pp. 349-359.
- [13] Esmailzadeh Kenari. R, Mohsenzadeh. F, Amiri. Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Food science & nutrition*, doi: 10.1002/fsn3.118.
- [14] Bimakr, M., Abdul Rahman, R., Saleena Taip, F., Mohd Adzahan, N., Islam Sarker, M.d.Z. and Ganjloo, A. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules*, 17: 11748-11762.
- [15] Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. 2004. Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- [16] Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102: 1233-1240.
- [17] Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: pp. 49-55. total phenolic contents of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83:547- 550.
- [18] Wong, M.L., R.E, Timms. and E.M, Goh. 1988. Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 65:258-261 Zaveri, N. T. 2006, Green tea and applications, *Life Sciences*, 78 :2073-2080.
- [19] Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen, P. H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 140-146.
- [20] Melendez, A. J. Bejines, E. Vicario, I.M. and Heredia, F. J. 2004. Vitamin c in orange

- [34] Hedayat Zadeh Abhari, M and Esmailzadeh Kenari, R. 2013. Effect of different extraction methods (ultrasound and microwave) on antioxidant properties of leaf extract. The 2nd national conference on optimization of production, distribution and consumption chain in the food industry, Sari, Iran. (In Persian)
- [35] Bagheri. M., Radi.M. 2015, Ascorbic acid (vitamin C), The first national conference on defective defense in agriculture, natural resources and environment with a sustainable development approach, Tehran, Center for sustainable development. [In Persian.]
- [36] Jagannath, A. and Biradar, R., 2019. Comparative Evaluation of Soxhlet and Ultrasonics on the Structural Morphology and Extraction of Bioactive Compounds of Lemon (*Citrus limon* L.) Peel. *Food Chem Nanotechnol*, 5, pp.56-64.
- [37] Chemat, F., Tomao, V. and Viot, M., 2008. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of food analysis instruments*, pp.85-103.
- [30] Demurin. Y. 1986. Phenotypic Variability and Correlation between Tocopherol Content and Some Biochemical Characters in Sunflower Seeds (in Russian). *Sci. Tech Bull. VNIIMK, Krasnodar*. 93:21-24.
- [31] Ghasemi. H., Ismael Zade Kenari. R., Mir Ahmadi .F. 2017. Effect of extraction treatments on antioxidant properties of fruit juice extract. The 2nd National Conference on New Achievements in Health and Nutrition. Tehran-Iran. Article code: 10043. [In Persian.]
- [32] Dorman. H. J, Kosar. D. M, Kahlos. K, Holm. Y, Hiltunen. R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *J Agric Food Chem*. 51: 4563 4569.
- [33] Mohdaly. A. A. A, Iryna. S, Mohamed. F. R, Mohamed. A. S, Mahmoud. A. 2011. Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Ind. Crops Prod*. 34: 952 959.



## A comparative study between maceration, microwave and ultrasound methods for extraction sour lemon peel extract and its antioxidant properties

Latifi, Z.<sup>1\*</sup>, Darvish Hoseini, M.<sup>2</sup>, Seddighi Pashaki, A.<sup>3</sup>, Ghafoori, Z.<sup>4</sup>, Najafi, L.<sup>5</sup>, Arjmandian, A.<sup>6</sup>

1. Young Researchers and elite Club, Sari Branch, Islamic Azad University, Mazandaran, Iran.
2. Bachelor of food industry Engineer, Payame noor Qazvin center university, Qazvin, Iran.
3. Master of Food Engineering, Tehran University, Tehran, Iran.
4. Phd student of hygienic and food quality control faculty of veterinary medicine department of governmental shahid Chamran ahvaz university Ahvaz-Iran.
5. Agricultural Engineering and Food Science, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Guilan, Iran.
6. M.s.c. graduated, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ayatollah amoli Branch, Mazandaran, Iran.

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 2019/04/27  
Accepted 2021/08/07

#### Keywords:

Antioxidant Activity,  
Lemon Peel Extract,  
Maceration Method,  
Ultrasound,  
Microwave.

DOI: 10.52547/fsc.t.18.09.27

\*Corresponding Author E-Mail:  
yasamin.latifi131@yahoo.com

Citrus Lemon is one of the medicinal herbs that is cultivated mainly because of its alkaloids, nutritional properties and antioxidants. Lemon peel extract is rich in tocopherol, phenol, flavonoids and vitamin C, and has an antioxidant activity. The purpose of current study was to investigate the effect of solvent, microwave and ultrasound extraction on the antioxidant properties of sour lemon extract. The effects of different methods extraction such as soaking, microwave and ultrasound carried out using water: ethanol solvent (30:70) on amount extraction of tocopherol and phenolic compounds and antioxidant activity, and the study of colorless process of  $\beta$ -carotene-linoleic and the amount of vitamin C in extract of lemon peel to obtain the best extraction efficiency for proper use of the extract. And the antioxidant activity and the inhibitory effect of the linoleic acid oxidation of the extract were compared with synthetic antioxidant BHT. The results showed that the phenolic compounds (480 mg gallic acid/gram), tocopherol (145 mg/ml) and ascorbic acid (85 mg/100 g) in the ultrasonic extraction method had the highest content. Also, the percentage of free radical scavenging DPPH (91%) and the colorless process of  $\beta$ -carotene-linoleic (58%) in the extract extracted by ultrasound showed the highest percentage of inhibition, however, they had a lower percentage of inhibition compared to BHT. According to the results of this study, using an ultrasound method, an extract can be obtained that does not significantly differ with the antioxidant BHT level in terms of antioxidant activity.